

THESIS

MÜNCHEN
München

1968

**Der Einfluß von Tabakrauch
und Nikotin auf die
Thiosulfat-Schwefeltransferase
im tierischen Organismus**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

ELKE KATHRIN SCHULZ



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153307_0137

Aus dem klinisch-chemischen Institut an der
chirurgischen Universitätsklinik München
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

DER EINFLUSS VON TABAKRAUCH UND NIKOTIN
AUF DIE THIOSULFAT-SCHWEFELTRANSFERASE
IM TIERISCHEN ORGANISMUS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt

von

Elke Kathrin Schulz

aus

Batzdorf/OS

München 1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Schievelbein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. F. Marguth

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Oktober 1968

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Problemstellung	4
III. Methodik	5
1. Bestimmung der Enzymaktivität und des Rhodanidgehalts	6
2. Proteinbestimmung	7
IV. Ergebnisse	8
1. Einfluß von Tabakrauch	8
a) Untersuchungen in vitro	8
b) Untersuchungen in vivo: Enzymaktivitäten und Rhodanidkonzentrationen in Organen von Meerschweinchen nach Tabakrauchexposition	9
2. Einfluß von Nikotin	14
a) Untersuchungen in vitro	14
b) Untersuchungen in vivo	15
α) Kurzzeitversuche: Enzymaktivitäten und Rhodanidkonzentrationen in Gl. submaxillares von Hunden	15
β) Langzeitversuche: Enzymaktivitäten und Rhodanidkonzentrationen in Organen von Meerschweinchen	18
V. Diskussion	27
VI. Zusammenfassung	30
VII. Literaturverzeichnis	31

I. EINLEITUNG

Seit geraumer Zeit ist ein Zusammenhang zwischen Rauchen und Cyanidstoffwechsel im menschlichen Organismus bekannt. Als erster beobachtete Claude Bernard eine wesentlich höhere Rhodanidausscheidung bei Rauchern als bei Nichtrauchern (1). Nach dem Ergebnis mehrerer Untersuchungen (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12) ist der Rhodanidgehalt im Serum von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern deutlich erhöht. Raucher scheiden größere Mengen Rhodanid in Speichel (3,11,13). Urin (1,4,11,13,15,16,17,18) und Schweiß (3) aus als Nichtraucher.

1894 stellte S. Lang (19) fest, daß bei Tieren Cyanid als Rhodanid ausgeschieden wird; die enzymatische Umwandlung wurde 1933 von K. Lang beschrieben (20). Das Enzym erhielt den Namen Rhodanese (systematischer Name jetzt: Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransferase, E. C. 2.8.1.1.) und konnte außer im Blut in allen Organen des menschlichen und tierischen Organismus mit erstaunlich hohen Aktivitäten gefunden werden. Die Leber mit der höchsten Aktivität wird als der hauptsächliche Ort der Rhodanbildung angesehen (20).

Der Rhodanidgehalt in Geweben ist von der Aktivität des Enzyms, das spezifisch für freie, nicht organisch gebundene CN^- -Gruppen ist, und der Menge des zu entgiftenden Cyanids abhängig. Zwischen Thiosulfat-Schwefeltransferase-Aktivität und Rhodanidgehalt der Organe besteht nach Reinwein (21) keine Beziehung. Die tägliche Rhodanidbildung im menschlichen Organismus beträgt 2 - 3 mg, die alimentäre Zufuhr 1,2 mg. Auffallend ist die hohe Aktivität des Enzyms verglichen mit der Größenordnung des Rhodanidstoffwechsels.

Im Organismus bestehen mehrere Möglichkeiten, aufgenommenes Cyanid zu entgiften:

- 1) Die Thiosulfat-Schwefeltransferase entgiftet ca. 80 % des anfallenden Cyanids durch enzymatische Umwandlung von CN^- zu SCN^- mithilfe eines Schwefeldonators (22). Nach Zufuhr von mit C^{14} markiertem Cyanid bei Hunden erschien der größte Teil als $SC^{14}N^-$ im Urin (23,24). Der Anstieg der Rhodanidausscheidung bei Rauchern ist daher durch Entgiftung der durch Tabakrauch aufgenommenen Cyanidmenge zu erklären (4,6,12,15). Nach Darby und Wilson (25) liegt der Gehalt an gebildeter Blausäure in Pfeifenrauch zwischen 0,27 und 0,40 mg HCN/g gerauchter Tabak, in Zigarettenrauch um 0,55 mg HCN/g gerauchter Tabak.

- 2) Spuren von aufgenommenem Cyanid werden mit der Atemluft ausgeschieden und zwar in Abhängigkeit vom Basalstoffwechsel (23).
- 3) Im tierischen Organismus kann aus Cyanid CO_2 und Formiat gebildet werden, welche in den Stoffwechsel der C_1 -Fragmente eintreten und daher in der Methylgruppe von Cholin und Methionin und in den Harnsäure-C-Atomen des Allantoin erscheinen (23).
- 4) Cyanid kann sich mit Cystin zu 2-Iminothiazolidin-4-carboxylsäure verbinden: Nach subcutaner Injektion von KCN bei Ratten kann dieses Produkt als 14 % der applizierten Dosis aus dem Urin isoliert werden (22).
- 5) Nach Boxer und Rickards (23) erscheint bei Applikation von mit C^{14} markiertem Natriumcyanid bei Hunden auch ein geringer Anteil in der CN^- -Gruppe des Cyanocobalamin.

Dieser letztere Weg der Entgiftung eröffnet neue interessante Aspekte des Cyanstoffwechsels, was durch die im folgenden beschriebenen Ergebnisse näher erläutert werden soll:

Die Injektion subletaler Dosen Cyanid bei Ratten verursacht einen signifikanten Abfall des Vitamin- B_{12} -Gehaltes in der Leber (26). Die Verabreichung von Hydroxocobalamin konnte Versuchstiere gegen letale Cyanid-Dosen und neuropathologische Störungen schützen, die in einer Demyelination, verbunden mit Ödemen, neuraler Degeneration und Zellverlust im Gehirn, bestehen, weil das Cyanid von Hydroxocobalamin aufgenommen und durch Umwandlung zu Cyanocobalamin entgiftet wurde (27, 28).

Wokes und Picard (29) fanden bei Vegetariern sehr niedrige Vitamin B_{12} -Werte im Serum und eine erhöhte Rhodanidausscheidung im Urin, die durch orale und parenterale Gaben von Vitamin B_{12} reduziert werden konnten (29).

Bei starken Rauchern ist der Cyanocobalamin-Gehalt im Plasma leicht erhöht (30), die Konzentration an Gesamt-Vitamin B_{12} im Kammerwasser zeigt niedrigere Werte als bei Nichtrauchern (31). Nach Wilson und Matthews (10) besteht ein umgekehrtes Verhältnis zwischen Cyanid-Konzentration und totalem Vitamin B_{12} -Gehalt im Serum.

Diese klinischen und experimentellen Untersuchungen berechtigen zu der Annahme eines Zusammenhanges zwischen Vitamin B_{12} - und Cyanid-Stoffwechsel und einer Beeinflussung des B_{12} -Stoffwechsels durch eine relativ hohe Cyanidaufnahme beim Rauchen (8, 10, 15, 23, 26, 27, 28, 29, 32, 33).

Die Hypothese, daß Störungen dieses miteinander verbundenen Stoffwechsels ein entscheidender pathogenetischer Faktor bei der Tabakamblyopie, der retrobulbären Neuritis bei perniziöser Anämie, der von Leber beschriebenen hereditären Opticus-Atrophie und gewissen tropischen neurologischen Syndromen sind, die bei hoher CN^- -Aufnahme aus dem Maniokstrauch entstehen, wird durch neuere Befunde stark unterstützt (10, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37):

Obgleich bei Patienten, die an Tabakamblyopie leiden, der durchschnittliche Tabakverbrauch höher liegt, ist der Rhodanidgehalt im Serum deutlich niedriger als bei nicht-amblyopen, also gesunden Rauchern und ähnelt somit den Konzentrationen bei Nichtrauchern (13). Diese relativ reduzierten SCN^- -Werte machen die Annahme sehr wahrscheinlich, daß der Tabakamblyopie eine biochemische Veränderung zugrunde liegt. Da durch diese Veränderung die Umwandlung der durch das Rauchen erhöhten Cyanidzufuhr in Rhodanid verhindert wird, würde damit der Entgiftungsmechanismus über die Umwandlung von Hydroxocobalamin zu Cyanocobalamin stärker ausgenutzt, was zu einem Absinken des Hydroxocobalamin-Gehalts in Serum und Leber führt (27, 28, 32, 35).

Es ist weiterhin von Interesse, daß bei Patienten mit Tabakamblyopie, die bei beibehaltenen Rauchgewohnheiten mit täglich 1 mg Hydroxocobalamin i. m. behandelt wurden, im Vergleich zu Patienten, die Cyanocobalamin erhielten, eine deutliche Verbesserung von Sehschärfe und Farbsehen schon nach einer Woche Behandlung festgestellt werden konnte (32, 38).

II. PROBLEMSTELLUNG

Die oben angeführten experimentellen Befunde und klinischen Beobachtungen lassen wechselseitige Beziehungen zwischen Cyanid- und Vitamin B₁₂-Stoffwechsel und bestimmten neurologischen Erkrankungen, insbesondere der Tabakamblyopie erkennen. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann eine Beeinflussung des Vitamin B₁₂-Stoffwechsels und die Entstehung der erwähnten neurologischen Syndrome nur durch nicht im Rhodanid gebundenes CN⁻ hervorgerufen werden. Dies würde bedeuten, daß die Aktivität des Rhodanid bildenden Enzyms nicht ausreicht, um alles zugeführte Cyanid zu entgiften. Eine Verringerung der Aktivität des Enzyms könnte durch einen genetischen Defekt oder durch exogene Inhibitoren verursacht sein.

Aus diesen Gründen sollte das Verhalten der Thiosulfat-Schwefeltransferase und der Rhodanidkonzentration unter dem Einfluß von Tabakrauch und seinem pharmakologisch aktivsten Bestandteil, dem Nikotin, als exogenen Inhibitoren im tierischen Organismus untersucht werden.

III. METHODIK

Nach Töten und Entbluten der Tiere wurden die zu untersuchenden Organe vom Bindegewebe freipräpariert und bei -18°C in der Kühltruhe eingefroren. Im Gegensatz zu Homogenaten, die durch Einfrieren einen Aktivitätsverlust bis zu 50 % zeigten, konnte bei eingefrorenen Organen keine Abnahme der Enzymaktivität gefunden werden. In Abhängigkeit von der Aktivität wurden die Organe 10 Minuten im Verhältnis 1:10 oder 1:20 mit Aqua bidestillata homogenisiert.

Sörbo (39) stellte durch fraktionierte Zentrifugation fest, daß die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase fast zu gleichen Teilen auf die Mitochondrienfraktion und das Cytoplasma verteilt ist. Er fand rund 70 % eines Leberhomogenats von Meerschweinchen im Überstand. Diese Beobachtung stimmt mit meinen Ergebnissen überein.

Tabelle 1

Abhängigkeit der Enzymaktivität und des Proteingehaltes eines Meerschweinchenleberhomogenates von der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Mittelwert aus 3 Bestimmungen.

t = 30 Min. U/Min = Umdrehungen/Minute

E/g Frischgewicht = Internationale Einheiten/g Frischgewicht

U/Min	E/g FG	mg Protein/g FG
5 000 x g	107,1	216
8 000 x g	98,8	192
12 000 x g	93,3	180
15 000 x g	87,5	168
20 000 x g	69,6	156
30 000 x g	69,5	144
40 000 x g	69,4	120
50 000 x g	69,0	108
60 000 x g	68,5	96

Nach Zentrifugation mit verschiedenen Geschwindigkeiten erhielt ich bei gleichbleibender Zentrifugationszeit im Überstand beginnend mit 20 000 x g konstante Enzymaktivitäten bei abfallenden Proteinwerten (siehe Tabelle 1). Um konstante Bedingungen zu schaffen, benutzte ich daher nur den Überstand des 50 000 x g Zentrifugats zur Enzymuntersuchung.

1) Zur Messung der Thiosulfat-Schwefeltransferase-Aktivität wurde die Methode von Sörbo (39) nach der Darstellung von Lang (40) mit geringen Modifikationen verwendet: Sörbo bestimmte die Aktivität bei pH 7,4; nach Reinwein (21) besitzt das Enzym ein breites pH-Optimum zwischen 8,0 und 9,0. Ich ersetzte daher den Phosphatpuffer von pH 7,4 durch einen 0,2 m Trispuffer von pH 8,6.

Reagentien:

0,125 m Natriumthiosulfat

0,2 m Trispuffer pH 8,6

0,25 m Kaliumcyanid

35 %iger Formaldehyd

Eisennitratreagens, das in 1000 ml

100 g (FeNO_3)₃ · 9 H₂O und 200 ml 65%ige HNO₃ enthält.

0,5 ml Organhomogenat wurde mit 1,0 ml Natriumthiosulfat, 0,5 ml Trispuffer und 0,5 ml Kaliumcyanid 5 Minuten bei pH 8,6 und 20 ± 1°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von KCN gestartet und mit 0,5 ml Formaldehyd beendet.

Nach Zugabe von 2,5 ml Eisennitratreagens bildet sich mit dem enzymatisch entstandenen Rhodanid eine orangerote Komplexverbindung, deren Extinktion 30 Minuten nach Auffüllen mit 25 ml Aqua bidestillata bei 460 mμ in einer 10 mm Glasküvette im Zeiss Spektralphotometer gemessen wurde. Auftretende Trübungen, die durch Ausflocken des denaturierten Eiweißes entstanden waren, wurden durch Filtration beseitigt.

Der endogene Rhodanidgehalt der Organe wurde mithilfe derselben Methode in jedem Ansatz mitbestimmt und von dem gesamten Thiocyanatgehalt subtrahiert, um den Betrag des enzymatisch gebildeten Rhodanids zu erhalten.

Die Aktivität des Enzyms ist als μMol gebildetes Rhodanid/Minute/mg Protein ausgedrückt, was nach der internationalen Definition 1 Einheit (1 E) entspricht. Aus praktischen Überlegungen sind die Aktivitätswerte in mE, d. h. 10⁻³ E angegeben.

2) Zur Proteinbestimmung diente die von Weichselbaum beschriebene Biuretmethode (41). Die optischen Messungen wurden am Zeiss Spektralphotometer ausgeführt.

Nikotin wurde als freie Base benutzt, mit Stickstoff destilliert und redestilliert und bis zum Gebrauch unter Luftabschluß und im Dunklen aufbewahrt.

Die Signifikanzberechnungen wurden mit dem t-Test nach Student vorgenommen.

IV. ERGEBNISSE

1) Einfluß von Tabakrauch

a) Untersuchungen in vitro

10 ml des Homogenats wurden in eine Gaswaschflasche mit Fritte suspendiert. Der Zigarettenrauch wurde mithilfe einer Wasserstrahlpumpe durch das Homogenat geleitet. Die Berauchung erfolgte unter folgenden Bedingungen (42): Zugdauer 2 Sekunden, Zugfrequenz 1 Zug/Minute. Das Zugvolumen war so eingestellt, daß von jeder Zigarette 6 Züge bis zu einer Markierung abgeraucht werden konnten; das entspricht einer durchschnittlich verrauchten Tabakmenge von 0,81 g/Zigarette.

Die benutzten Zigaretten waren eine deutsche Sorte ohne Filter, die aus einer Mischung von Virginia- und Orienttabaken hergestellt wird.

Die berauchten Organhomogenate und unberauchten Kontrollhomogenate wurden wie oben angeführt zentrifugiert und anschließend die Messung der Enzymaktivität vorgenommen.

Das Hindurchleiten von Luft durch die Homogenate in derselben Weise wie Rauch hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. Durch photometrische Bestimmung einer Standardlösung von Kaliumrhodanid und der gleichen Lösung, durch die in oben angeführter Weise der Rauch von 2 Zigaretten geleitet wurde, konnte eine Beeinflussung der der Aktivitätsmessung zugrunde liegenden Reaktion durch Tabakrauchbestandteile ausgeschlossen werden.

Die durchschnittliche Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in normalen Meerschweinchenleberhomogenaten beträgt 1100 mE/mg Protein. Das Enzym wird durch Tabakrauch in Abhängigkeit von der applizierten Zigarettenanzahl gehemmt. Die mittlere Aktivität von Meerschweinchenleberhomogenaten, die dem Rauch von 2 Zigaretten (das entspricht einer Tabakmenge von ungefähr 1,6 g) ausgesetzt waren, beträgt 182 mE/mg Protein. Die Hemmung des Enzyms durch Tabakrauchbestandteile beläuft sich zwischen 81 und 87 %. Einzelwerte siehe Tabelle 2.

Tabelle 2

Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in Meerschweinchenleberhomogenaten, die dem Rauch von 2 Zigaretten ausgesetzt waren.

Berauchte Homogenate $n = 3$

Normale Homogenate zur Kontrolle $n = 3$

Werte: mE/mg Protein

Homogenat	Kontrolle	Beraucht	Hemmung in %
1	1060	201	81
2	1125	143	87,3
3	1125	201	82,2
Mittelwert	1103	182	83,5

b) Untersuchungen in vivo: Enzymaktivitäten und Rhodanidkonzentrationen in Organen von Meerschweinchen nach Tabakrauchexposition

Entsprechend der Versuchsanordnung von Dontenwill (42) wurde ein Berauchungssystem konstruiert, das aus einem Exsiccator von ca. 15 l Inhalt mit 2 Öffnungen bestand. Ein Y-Stück, das als Berauchungskopf diente und 2 Zigaretten aufnehmen konnte, wurde mit der einen Öffnung, eine Wasserstrahlpumpe mit einem dazwischengeschalteten Dreiwegehahn mit der zweiten Öffnung luftdicht verbunden. Die in den Exsiccator gesetzten Tiere konnten nun mit konstantem Zugvolumen, Zugfrequenz und Zugdauer "beraucht" werden.

Als Kontrolltiere dienten die Meerschweinchen aus Versuch 2)b)β).

α) Weibliche Meerschweinchen von 250 bis 350 g Gewicht

wurden unter oben angeführten Bedingungen dem Rauch von 2 Zigaretten ausgesetzt. Die auftretenden akuten Intoxikationserscheinungen erforderten die Unterbrechung des Versuches.

Um einen Anhaltspunkt für die Menge des aufgenommenen Rauches zu gewinnen, bestimmte ich die CO-Hb-Konzentration im Kapillarblut der Tiere nach der Methode von Brückner und Desmond (43) in der Modifikation von Richterich

(44). Der gefundene Wert lag bei 46 %, einem Betrag, der kurz vor der Letalittsgrenze liegt und nach den Angaben von Leuchtenberger, Leuchtenberger und Weiss (45) ein Beweis für eine genügend hohe Rauchinhalation ist.

Tabelle 3

Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in Organen von einem Meer -
schweinchen, das dem Rauch von 2 Zigaretten ausgesetzt war. CO-Hb-Wert
im Blut 46 %.

Berauchte Tiere n = 1

Kontrolltiere n = 10 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Werte: mE/mg Protein

Organ	Kontrolltiere	Berauchtes Tier	Hemmung in %
G1. submaxillaris	373 $\pm$ 17	352	6
G1. parotis	502 $\pm$ 22	355	30
Leber	1115 $\pm$ 24	1095	0
Pankreas	41 $\pm$ 4	32	22
Lunge	304 $\pm$ 14	268	12
Niere	995 $\pm$ 17	1435	0
Herz	17 $\pm$ 1	53	0
Milz	68 $\pm$ 6	53	23
Großhirn	92 $\pm$ 7	74	20
Kleinhirn	316 $\pm$ 20	114	64
Hirnstamm	290 $\pm$ 11	122	58
Nebenniere	83 $\pm$ 6	75	10

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, ist die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltrans-
ferase schon nach Anwendung von 2 Zigaretten in mehreren Organen zu einem
beträchtlichen Prozentsatz erniedrigt. Auffallend ist, daß Organe mit der am
höchsten gefundenen Aktivität, wie Leber und Niere, durch Berauchung der Tie-
re nicht beeinflußt werden, wohingegen Organe mit mittlerer Aktivität, wie
G1. parotis, Kleinhirn und Hirnstamm sehr stark gehemmt sind.

Tabelle 4

Rhodianidkonzentrationen in Organen von einem Meerschweinchen, das dem Rauch von 2 Zigaretten ausgesetzt war.

Berauchte Tiere n = 1

Kontrolltiere n = 10 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Werte: $\mu\text{g SCN}^-/\text{g Frischgewicht}$

Organ	Kontrolltiere	Berauchtes Tier	Abweichung vom Kontrollwert
G1. submaxillaris	502 $\pm$ 12	324	- 178
G1. parotis	199 $\pm$ 9	300	+ 101
Leber	495 $\pm$ 14	300	- 195
Pankreas	196 $\pm$ 5	176	- 20
Lunge	333 $\pm$ 19	266	- 67
Niere	488 $\pm$ 14	440	- 48
Herz	331 $\pm$ 18	290	- 41
Milz	309 $\pm$ 17	174	- 135
Großhirn	226 $\pm$ 6	280	+ 54
Kleinhirn	182 $\pm$ 16	250	+ 68
Hirnstamm	177 $\pm$ 33	220	+ 43
Nebenniere	403 $\pm$ 5	210	- 193

In Tabelle 4 ist der Rhodianidgehalt der untersuchten Organe aufgeführt. Die Rhodianidwerte von Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm und G1. parotis sind im Gegensatz zu allen anderen Organen erniedrigt.

β) Nach Dontenwill (42) soll der CO-Hb-Gehalt im Blut bei Berauchungsversuchen 40 % nicht überschreiten, da sonst, abgesehen von der Letalität, weder normales Atemvolumen noch normale Atemfrequenz - und somit größtmögliche Rauchinhalation - der Tiere gewährleistet ist. Um diesen Anforderungen zu entsprechen, die Anzahl der abgerauchten Zigaretten aber erhöhen zu können, mußte zur Frischluftzufuhr eine Zwischenbelüftung eingeführt werden. Unter Beibehaltung von Zugfrequenz und Zugdauer wurde daher vor jedem Zug für 10 sec zwischenbelüftet. Auf diese Weise war es möglich, die Meerschweinchen dem Rauch von 5 kontinuierlich abgerauchten Zigaretten auszusetzen, was

zweimal im Ablauf von 12 Stunden durchgeführt wurde. Die CO-Hb-Werte der unter diesen Bedingungen berauchten Tiere lagen zwischen 25 und 35 %.

Eine Zigarette enthält ca. 1 mg Nikotin. Im Idealfall wären daher von jedem Tier im Verlaufe von 12 Stunden 10 mg Nikotin aufgenommen worden, eine Menge, die dem in Versuch 2)b)ß)2) subcutan injizierten Nikotin entspricht.

Die Tiere wurden sofort nach Versuchsende getötet und entblutet. Die Bestimmung der Enzymaktivität und des Rhodanidgehalts der eingefrorenen Organe erfolgte nach der angegebenen Methode.

Wie aus Tabelle 5 entnommen werden kann, ist das Enzym nach Berauchung der Tiere mit 10 Zigaretten in mehreren Organen in signifikanter Weise gehemmt. Es kann herausgestellt werden, daß in Organen, die eine hohe Aktivität haben, wie Gl. submaxillaris, Gl. parotis, Kleinhirn und Hirnstamm, das Enzym ganz beträchtlich gehemmt ist, auch in Organen mit mittlerer Aktivität wie Großhirn und Nebenniere, während in Organen wie Leber und Niere, in denen die beobachtete Aktivität am höchsten war, keine Beeinflussung durch Berauchung der Tiere zu ermitteln war.

Bei Vergleich mit den Tieren, die mit 10 mg Nikotin s. c. behandelt wurden, ist die Größenordnung der Hemmung in den verschiedenen Organen als sehr ähnlich zu erkennen, außer in Leber, Pankreas, Lunge und Niere, die durch den Berauchungsprozeß nicht verändert wurden.

Tabelle 5

Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in Organen von Meerschweinchen, die dem Rauch von 10 Zigaretten ausgesetzt waren. CO-Hb-Werte zwischen 25 und 35 %.

Berauchte Tiere n = 4 Mittelwert und Standardabweichung der Mittelwertes
Kontrolltiere n = 10

Werte: mE/mg Protein

Organ	Kontrolltiere	Berauchte Tiere	Hemmung in %	Signifikanz
Gl. submaxillaris	373 $\pm$ 17	246 $\pm$ 16	29	p < 0,0025
Gl. parotis	502 $\pm$ 22	278 $\pm$ 9	45	p < 0,0005
Leber	1115 $\pm$ 24	1122 $\pm$ 68	0	K. S.
Pankreas	41 $\pm$ 4	46 $\pm$ 4	0	K. S.
Lunge	304 $\pm$ 14	283 $\pm$ 54	0	K. S.
Niere	995 $\pm$ 17	904 $\pm$ 45	0	K. S.
Herz	17 $\pm$ 1	11 $\pm$ 0,3	35	p < 0,01
Milz	68 $\pm$ 6	42 $\pm$ 8	38	p < 0,05
Großhirn	92 $\pm$ 7	53 $\pm$ 4	42	p < 0,005
Kleinhirn	316 $\pm$ 20	227 $\pm$ 4	28	p < 0,0125
Hirnstamm	290 $\pm$ 11	230 $\pm$ 7	21	p < 0,0025
Nebenniere	83 $\pm$ 6	54 $\pm$ 9	35	p < 0,005

In Tabelle 6 sind die Rhodanidkonzentrationen von Organen der berauchten Meerschweinchen registriert. Der Gehalt der meisten Organe an endogenem Rhodan ist signifikant erhöht mit Ausnahme der Gl. submaxillaris, in der er erniedrigt ist. In Lunge, Milz und Nebenniere konnte keine statistisch signifikante Änderung festgestellt werden. Die Rhodanidkonzentrationen in Leber, Niere, Kleinhirn, Hirnstamm und Gl. parotis sind auf das Doppelte des Kontrollwertes angestiegen. Beim Vergleich mit den Tieren, die mit 10 mg Nikotin s. c. behandelt wurden, sind die Rhodanidwerte in beiden Versuchsreihen in gleicher Höhe zu finden außer in der Gl. submaxillaris und Nebenniere, in denen sie bei Berauchung der Tiere erniedrigt sind.

Tabelle 6

Rhodauidkonzentrationen in Organen von Meerschweinchen, die dem Rauch von 10 Zigaretten ausgesetzt waren.

Berauchte Tiere n = 4 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes
Kontrolltiere n = 10

Werte: $\mu\text{g SCN}^-/\text{g}$ Frischgewicht

Organ	Kontroll- tiere	Berauchte Tiere	Signifi- kanz	Abweichung v. Kontrollwert
Gl. submaxillaris	502 $\pm$ 12	446 $\pm$ 42	$p < 0,05$	- 56
Gl. parotis	199 $\pm$ 9	412 $\pm$ 10	$p < 0,0005$	+ 213
Leber	495 $\pm$ 14	889 $\pm$ 23	$p < 0,0005$	+ 394
Pankreas	196 $\pm$ 5	357 $\pm$ 13	$p < 0,0005$	+ 161
Lunge	333 $\pm$ 19	284 $\pm$ 74	K. S.	+ 49
Niere	488 $\pm$ 14	837 $\pm$ 10	$p < 0,0005$	+ 349
Herz	331 $\pm$ 18	391 $\pm$ 25	$p < 0,05$	+ 60
Milz	309 $\pm$ 17	344 $\pm$ 7	K. S.	+ 35
Großhirn	226 $\pm$ 6	377 $\pm$ 31	$p < 0,0005$	+ 151
Kleinhirn	182 $\pm$ 17	358 $\pm$ 5	$p < 0,0005$	+ 176
Hirnstamm	177 $\pm$ 33	340 $\pm$ 6	$p < 0,005$	+ 163
Nebenniere	403 $\pm$ 5	348 $\pm$ 8	K. S.	- 55

2) Einfluß von Nikotin

a) Untersuchungen in vitro

Zur Bestimmung der Thiosulfat-Schwefeltransferase-Aktivität unter dem direkten Einfluß von Nikotin im Homogenat wurde dem zu inkubierenden Ansatz vor Zugabe des KCN Nikotin in der Konzentration von 10^{-2} Mol und 10^{-3} Mol hinzugefügt. Die Aktivitätsmessung dieser und der Kontrollansätze wurde wie oben angegeben durchgeführt.

Nikotin in Konzentrationen bis zu 10^{-2} Mol hat keinen Einfluß auf die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase verschiedener Organhomogenate in vitro.

In Submaxillarishomogenaten vom Hund fand ich durchschnittliche Aktivitäten von 122 mE/mg Protein, wenn dem Ansatz Nikotin in der Konzentration von 10^{-3} Mol zugesetzt war. Die Werte der Kontrollen beliefen sich auf 120 mE/mg Protein im Mittel. Bei Zusatz von 10^{-2} Mol Nikotin lagen die Werte um 107 mE/mg Protein, die der Kontrollen um 108 mE/mg Protein.

b) Untersuchungen in vivo:

α) Kurzzeitversuche: Enzymaktivitäten und Rhodanidkonzentrationen in Gl. submaxillares von Hunden

Als Versuchstiere dienten Hunde mit 20 - 30 kg Gewicht, die in mitteltiefer Pernoctonnarkose intubiert wurden. Während der länger dauernden Versuche wurde Reo-Macrodex so langsam infundiert, daß der Blutdruck dabei konstant blieb.

A) Zur parenteralen intraarteriellen Verabreichung von Nikotin wurde die von Lorenz et al. (46) angegebene Methode benutzt, mithilfe derer es möglich ist, den Einfluß von Pharmaka auf die Speicheldrüsen direkt in vivo zu untersuchen. Dazu wurde die A. thyreoidea superior unterbunden und ein Katheder retrograd in die A. carotis bis in die Höhe der A. maxillaris externa vorgeschoben. Muskeläste wurden permanent, die A. carotis interna bei weit distalem Abgang nur kurzfristig bei der Injektion unterbunden. Auf diese Weise gelangte die applizierte Dosis Nikotin praktisch vollständig beim ersten Durchlauf in die Drüse.

In dieser Anordnung wurde den Hunden 12 μ g/kg Nikotin i. a. verabreicht. Nach 5 Minuten Latenzzeit wurde die Drüse exstirpiert und eingefroren. Die contralaterale Drüse wurde vor Versuchsbeginn entfernt und als Kontrolle verwendet.

B) Narkotisierten Hunden wurde 400 μ g Nikotin i. v. jugularis injiziert. Nach 5 Minuten Latenz wurde die Drüse exstirpiert und eingefroren. Die contralaterale Drüse wurde vorher entfernt und als Kontrolle verwendet.

C) Um Veränderungen in der Enzymaktivität durch die Manipulation im Operationsgebiet und den Injektionsmechanismus auszuschließen, wurde in der beschriebenen Weise 10 ml 0,9%ige Physiologische Kochsalzlösung injiziert und die Drüse nach 5 Minuten entnommen. Die contralaterale Drüse wurde vorher entfernt und als Kontrolle benutzt.

D) Zur weiteren Kontrolle dienten die Gl. submaxillares unbehandelter Hunde.

E) Die während anderer Versuchsreihen mit Kallikrein, Parasympathomimetica, Histamin und Antihistaminica in der oben angeführten Weise behandelten Drüsen von Hunden wurden auf ihren Einfluß auf die Thiosulfat-Schwefeltransferase-Aktivität untersucht. Zur Kontrolle dienten die vorher entfernten contralateralen Drüsen.

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, ist der kurzdauernde Einfluß von Nikotin auf die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in Speicheldrüsen von Hunden nicht eindeutig zu beurteilen. Die Enzymaktivitäten sind sowohl bei intraarteriell als auch intravenös verabreichtem Nikotin im Vergleich zu den Aktivitäten der vor Versuchsbeginn entfernten contralateralen Drüsen, der Drüsen von Hunden, denen physiologische Kochsalzlösung verabreicht wurde, und Drüsen völlig unbehandelter Hunde leicht erhöht, doch konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

Auch im Rhodanidgehalt der mit Nikotin behandelten Drüsen ließ sich keine signifikante Änderung im Vergleich zu den Kontrolldrüsen feststellen.

Die Aktivität des Enzyms und der Rhodanidgehalt von Gl. submaxillares beim Hunde werden durch Pharmaka, die im Rahmen anderer Versuchsreihen in der beschriebenen Anordnung appliziert wurden (Parasympathomimetica, Histamin, verschiedene Antihistaminica und Kallikrein) nicht verändert.

Tabelle 7

Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase und Rhodanidkonzentrationen in Gl. submaxillares von Hunden.

- A) $n = 4$ Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes
 1) Drüse nach Injektion von $12 \mu\text{g/kg}$ Nikotin i. a. carotis
 2) Kontrolle: vor Versuchsbeginn entfernte contralaterale Drüse
- B) $n = 3$ Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes
 1) Drüse nach Injektion von $400 \mu\text{g}$ Nikotin i. v. jugularis
 2) Kontrolle: vor Versuchsbeginn entfernte contralaterale Drüse
- C) $n = 5$ Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes
 1) Drüse nach Injektion von $10 \text{ ml } 0,9\%$ iger physiologischer Kochsalzlösung i. a. carotis
 2) Kontrolle: vor Versuchsbeginn entfernte contralaterale Drüse
- D) $n = 6$ Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes
 Unbehandelte Tiere
- E) $n = 4$ Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes
 Tiere, die innerhalb anderer Versuchsreihen mit Kallikrein, Parasympathomimetica, Histamin und Antihistaminica behandelt wurden
 1) Drüse nach Verabreichung derobigen Pharmaka
 2) Kontrolle: vor Versuchsbeginn entfernte contralaterale Drüse

Werte: Enzymaktivität in mE/mg Protein

Rhodanidgehalt in $\mu\text{g SCN}^-/\text{g}$ Frischgewicht

		Enzymaktivität	Rhodanidgehalt
A)	1)	126 ± 14	402 ± 49
	2)	98 ± 15	324 ± 37
B)	1)	136 ± 39	329 ± 19
	2)	112 ± 25	227 ± 97
C)	1)	86 ± 10	424 ± 41
	2)	86 ± 7	451 ± 31
D)		95 ± 30	477 ± 9
E)	1)	89 ± 6	418 ± 40
	2)	89 ± 12	417 ± 36

ß) Langzeitversuche: Enzymaktivitäten und Rhodanidkonzentrationen in Organen von Meerschweinchen

1) Weiblichen Meerschweinchen mit einem Gewicht zwischen 250 und 350 g wurde während 7 Tagen 5 mg Nikotin im Abstand von 12 Stunden subcutan injiziert. Die Gesamtdosis an Nikotin betrug 70 mg. 30 Minuten nach der letzten Injektion, 156 Stunden nach Versuchsbeginn, wurden die Tiere getötet, die Organe freipräpariert und eingefroren. Die Enzymaktivitäten wurden wie oben angegeben bestimmt.

Als Kontrolltiere wurden Meerschweinchen verwendet, die in derselben Weise mit 5 ml 0,9% iger physiologischer Kochsalzlösung behandelt worden waren.

Die Enzymaktivitäten fast aller Organe von Meerschweinchen, die wie oben beschrieben behandelt wurden, sind in statistisch signifikanter Weise gehemmt (Tabelle 8). Pankreas und Nebenniere sind nicht von diesem Befund betroffen. In den anderen Organen beläuft sich die Hemmung zwischen 12 und 68 %. Die höchsten Hemmwerte sind in Parotis, Großhirn und Hirnstamm, die niedrigsten in Leber und Niere zu finden.

Tabelle 8

Einfluß von Nikotin im Langzeitversuch (70 mg über 7 Tage) auf die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in Organen von Meerschweinchen.

Behandelte Tiere n = 7

n = 10 bei Gl. submaxillaris, parotis, Leber

Kontrolltiere n = 10

Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Werte: mE/mg Protein

Organ	Kontroll- tiere	Behandelte Tiere	Hemmung in %	Signifi- kanz
Gl. submaxillaris	373 $\pm$ 17	307 $\pm$ 13	18	p < 0,0025
Gl. parotis	502 $\pm$ 22	163 $\pm$ 18	68	p < 0,0005
Leber	1115 $\pm$ 24	964 $\pm$ 29	14	p < 0,0005
Pankreas	41 $\pm$ 4	44 $\pm$ 3	0	K. S.
Lunge	304 $\pm$ 14	169 $\pm$ 6	45	p < 0,0005
Niere	995 $\pm$ 17	874 $\pm$ 28	12	p < 0,0025
Herz	17 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	47	p < 0,0025
Milz	68 $\pm$ 6	36 $\pm$ 3	47	p < 0,0025
Großhirn	92 $\pm$ 7	48 $\pm$ 3	48	p < 0,0005
Kleinhirn	316 $\pm$ 20	270 $\pm$ 24	15	p < 0,1
Hirnstamm	290 $\pm$ 11	170 $\pm$ 7	42	p < 0,0005
Nebenniere	83 $\pm$ 6	88 $\pm$ 4	0	K. S.

Bei diesen Tieren sind die endogenen Rhodanidwerte (Tabelle 9) in den meisten Organen signifikant erhöht, in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm fastum das Doppelte. In Pankreas ist die Konzentration signifikant erniedrigt, in Leber, Milz und Nebenniere konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

Tabelle 9

Einfluß von Nikotin im Langzeitversuch (70 mg über 7 Tage) auf die Rhodanidkonzentration in Organen von Meerschweinchen:

Behandelte Tiere n = 7

n = 10 bei Gl. submaxillaris, parotis, Leber

Kontrolltiere n = 10

Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Werte: $\mu\text{g SCN}^-/\text{g Frischgewicht}$

Organ	Kontrolltiere	Behandelte Tiere	Signifikanz	Abweichung v. Kontrollwert
Gl. submaxillaris	502 $\pm$ 12	528 $\pm$ 3	$p < 0,025$	+ 26
Gl. parotis	199 $\pm$ 9	273 $\pm$ 28	$p < 0,0005$	+ 74
Leber	495 $\pm$ 14	479 $\pm$ 5	K. S.	- 16
Pankreas	196 $\pm$ 5	151 $\pm$ 16	$p < 0,01$	- 45
Lunge	333 $\pm$ 19	489 $\pm$ 39	$p < 0,0025$	+ 156
Niere	488 $\pm$ 14	571 $\pm$ 13	$p < 0,005$	+ 83
Herz	331 $\pm$ 18	433 $\pm$ 20	$p < 0,0025$	+ 102
Milz	309 $\pm$ 17	309 $\pm$ 14	K. S.	0
Großhirn	226 $\pm$ 6	487 $\pm$ 68	$p < 0,0005$	+ 261
Kleinhirn	182 $\pm$ 16	305 $\pm$ 16	$p < 0,0005$	+ 123
Hirnstamm	177 $\pm$ 33	325 $\pm$ 22	$p < 0,0025$	+ 148
Nebenniere	403 $\pm$ 5	400 $\pm$ 2	K. S.	- 3

2) Um die Zeit herauszufinden, die nötig ist, die gefundenen Veränderungen in Enzymaktivität und Rhodanidgehalt der Organe hervorzurufen, führte ich folgende Versuchsanordnung durch: In der oben beschriebenen Weise wurden Meerschweinchen über verschieden lange Zeitabläufe mit Nikotin subcutan behandelt. 2 Tiere wurden 12 Stunden, 2 Tiere 60 Stunden, 2 Tiere 108 Stunden nach Versuchsbeginn getötet, die Menge des verabreichten Nikotins betrug demnach 10, 30 bzw. 50 mg.

Zur Kontrolle dienten die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tiere aus Versuch 2)b) (3).

Tabelle 10

Einfluß von 10 mg Nikotin auf die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in Organen von Meerschweinchen (Versuchsdauer 12 Stunden)

Behandelte Tiere n = 2 Mittelwert aus beiden Bestimmungen

Kontrolltiere n = 10 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Aufgrund der veränderten Proteinwerte dieser Tiere sind zum Vergleich die Enzymaktivitäten in E/g Frischgewicht angegeben.

Werte: mE/mg Protein E/g Frischgewicht

Organ	mE/mg Protein			E/g FG		
	Kon- troll- tiere	Behand. Tiere	Hem- mung in %	Kon- troll- tiere	Behand. Tiere	Hem- mung in %
Gl. submaxillaris	373 $\pm$ 17	349	7	37 $\pm$ 2	29	22
Gl. parotis	502 $\pm$ 22	331	34	34 $\pm$ 6	24	30
Leber	1115 $\pm$ 24	809	27	121 $\pm$ 3	79	35
Pankreas	41 $\pm$ 4	31	25	2,3 $\pm$ 0,2	1,7	26
Lunge	304 $\pm$ 14	237	23	18 $\pm$ 1	9	50
Niere	995 $\pm$ 17	797	20	70 $\pm$ 2	51	17
Herz	17 $\pm$ 1	15	12	0,4 $\pm$ 0,02	0,35	13
Milz	68 $\pm$ 6	38	45	4 $\pm$ 0,3	1,6	60
Großhirn	92 $\pm$ 7	93	0	3,3 $\pm$ 0,1	1,1	67
Kleinhirn	316 $\pm$ 20	509	0	10 $\pm$ 0,4	6	40
Hirnstamm	290 $\pm$ 11	655	0	7,2 $\pm$ 0,4	5,2	28
Nebenniere	83 $\pm$ 6	65	20	15 $\pm$ 1	12	20

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, ist die beschriebene Hemmwirkung des Nikotins auf die Thiosulfat-Schwefeltransferase-Aktivität schon nach Applikation von 10 mg Nikotin innerhalb von 12 Stunden festzustellen. Da bei diesen Tieren die Proteinwerte verschiedener Organe zum Teil bis auf ein Drittel der normalen Beträge abgesunken waren, ergibt sich bei Beurteilung der Aktivitäten bezogen auf den Proteingehalt ein den tatsächlichen Verhältnissen nicht entsprechendes Bild.

Daher sind zum Vergleich und zur besseren Beurteilung die Aktivitäten in E/g Frischgewicht mit angegeben. Somit ist in allen Organen eine deutliche Hemmung des Enzyms zu beobachten. In Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm wird bei Angabe in mE/mg Protein eine Erhöhung der Aktivität vorgetäuscht, die in Wirklichkeit auf die erniedrigten Proteinwerte zurückzuführen ist; denn in den E/g Frischgewicht-Angaben ist die Hemmung ganz deutlich zu konstatieren. Es ist auffallend, daß auch in Leber und Nebenniere, deren Aktivität nach Applikation von 70 mg Nikotin über 7 Tage nicht verändert war, eine Hemmung festgestellt werden konnte.

Tabelle 11

Einfluß von 10 mg Nikotin auf die Rhodanidkonzentration in Organen von Meer-schweinchen (Versuchsdauer 12 Stunden)

Behandelte Tiere n = 2 Mittelwert aus beiden Bestimmungen

Kontrolltiere n = 10 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwer-
tes

Werte: $\mu\text{g SCN}^-/\text{g Frischgewicht}$

Organ	Kontrolltiere	Behandelte Tiere	Abweichung v. Kontrollwert
Gl. submaxillaris	502 $\pm$ 12	642	+ 140
Gl. parotis	199 $\pm$ 9	595	+ 396
Leber	495 $\pm$ 14	870	+ 375
Pankreas	196 $\pm$ 5	415	+ 219
Lunge	333 $\pm$ 19	440	+ 107
Niere	488 $\pm$ 14	934	+ 466
Herz	331 $\pm$ 18	406	+ 75
Milz	309 $\pm$ 17	380	+ 71
Großhirn	226 $\pm$ 6	492	+ 266
Kleinhirn	182 $\pm$ 16	440	+ 258
Hirnstamm	177 $\pm$ 33	423	+ 246
Nebenniere	403 $\pm$ 5	485	+ 82

Auch in den Rhodanidkonzentrationen aller Organe (Tabelle 11) kann eine deutliche Veränderung im Sinne einer Erhöhung verzeichnet werden, die in Leber,

Niere, Parotis, Pankreas und den drei Gehirnabschnitten besonders stark ausgeprägt ist. Von diesem Befund sind also auch die Organe betroffen, die, wie Leber, Milz und Nebenniere, im Langzeitversuch nicht signifikant verändert oder, wie Pankreas, erniedrigt waren.

Tabelle 12

Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in Organen von Meerschweinchen nach Applikation von 30 mg Nikotin (Versuchsdauer 60 Stunden)

Behandelte Tiere n = 2 Mittelwert aus beiden Bestimmungen

Kontrolltiere n = 10 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Aufgrund der veränderten Proteinwerte dieser Tiere sind zum Vergleich die Enzymaktivitäten in E/g Frischgewicht angegeben

Werte: mE/mg Protein E/g Frischgewicht

Organ	mE/mg Protein			E/g FG		
	Kontrolltiere	Behand. Tiere	Hemmung in %	Kontrolltiere	Behand. Tiere	Hemmung in %
Gl. submaxillaris	373 $\pm$ 17	272	28	37 $\pm$ 2	25	33
Gl. parotis	502 $\pm$ 22	237	53	34 $\pm$ 6	25	28
Leber	1115 $\pm$ 24	1194	0	121 $\pm$ 3	105	13
Pankreas	41 $\pm$ 4	16	61	2,3 $\pm$ 0,2	0,6	74
Lunge	304 $\pm$ 14	108	65	18 $\pm$ 1	7	61
Niere	995 $\pm$ 17	806	19	70 $\pm$ 2	61	13
Herz	17 $\pm$ 1	6	65	0,4 $\pm$ 0,02	0,2	50
Milz	68 $\pm$ 6	22	68	4 $\pm$ 0,3	1,3	68
Großhirn	92 $\pm$ 7	26	72	3,3 $\pm$ 0,1	1,1	67
Kleinhirn	316 $\pm$ 20	12	96	10 $\pm$ 0,4	5,7	43
Hirnstamm	290 $\pm$ 11	35	88	7,2 $\pm$ 0,4	1,7	76
Nebenniere	83 $\pm$ 6	53	36	15 $\pm$ 1	9,5	37

Auch bei den mit 30 mg Nikotin behandelten Meerschweinchen (Versuchsdauer 60 Stunden) sind zum Teil noch veränderte Proteinwerte anzutreffen. Daher sind auch hier (Tabelle 12) die Ergebnisse in beiden Bezugsgrößen angegeben. Durch

Erhöhung des Proteingehaltes vor allem in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm wird bei der Angabe in mE/mg Protein eine größere Hemmung, d.h. niedrigere Aktivität vorgetäuscht, als dies in Wirklichkeit, bei Vergleich mit den auf Frischgewicht bezogenen Werten, zu konstatieren ist.

Tabelle 13

Rhodianidkonzentrationen in Organen von Meerschweinchen nach Applikation von 30 mg Nikotin (Versuchsdauer 60 Stunden)

Behandelte Tiere n = 2 Mittelwert aus beiden Bestimmungen

Kontrolltiere n = 10 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Werte: $\mu\text{g SCN}^-/\text{g Frischgewicht}$

Organ	Kontrolltiere	Behandelte Tiere	Abweichung v. Kontrollwert
Gl. submaxiilaris	502 $\pm$ 12	714	+ 212
Gl. parotis	199 $\pm$ 9	665	+ 466
Leber	495 $\pm$ 14	440	- 55
Pankreas	196 $\pm$ 5	496	+ 300
Lunge	333 $\pm$ 19	600	+ 267
Niere	488 $\pm$ 14	452	- 36
Herz	331 $\pm$ 18	640	+ 309
Milz	309 $\pm$ 17	617	+ 308
Großhirn	226 $\pm$ 6	480	+ 254
Kleinhirn	182 $\pm$ 16	572	+ 390
Hirnstamm	177 $\pm$ 33	620	+ 443
Nebenniere	403 $\pm$ 5	645	+ 242

In Tabelle 13 sind die Rhodianidkonzentrationen der Organe dieser Tiere aufgeführt, die alle, außer in Leber und Niere, erhöht und zum Teil auf mehr als das Doppelte des Kontrollwertes, wie in Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm und Parotis angestiegen sind.

Tabelle 14

Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase in Organen von Meerschweinchen, die mit 50 mg Nikotin behandelt wurden (Versuchsdauer 108 Stunden)

Behandelte Tiere n = 2 Mittelwert aus beiden Bestimmungen

Kontrolltiere n = 10 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Werte: mE/mg Protein

Organ	Kontrolltiere	Behandelte Tiere	Hemmung in %
G1. submaxillaris	373 $\pm$ 13	304	19
G1. parotis	502 $\pm$ 22	318	37
Leber	1115 $\pm$ 24	1033	0
Pankreas	41 $\pm$ 4	36	12
Lunge	304 $\pm$ 14	194	37
Niere	995 $\pm$ 17	967	0
Herz	17 $\pm$ 1	35	0
Milz	68 $\pm$ 6	38	44
Großhirn	92 $\pm$ 7	74	20
Kleinhirn	316 $\pm$ 20	280	12
Hirnstamm	290 $\pm$ 11	141	52
Nebenniere	83 $\pm$ 6	112	0

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der mit 50 mg Nikotin behandelten Tiere (Versuchsdauer 108 Stunden). Bei normalen Proteinwerten konnte eine Hemmung der Thiosulfat-Schwefeltransferase-Aktivität in allen Organen außer Leber und Niere festgestellt werden. In Herz und Nebenniere war die Aktivität erhöht.

Die Rhodanidkonzentrationen (Tabelle 15) sind in G1. submaxillaris, parotis, Pankreas, Kleinhirn und Hirnstamm erhöht, in Leber und Großhirn unverändert und in Lunge, Niere, Herz, Milz und Nebenniere erniedrigt.

Tabelle 15

Rhodianidkonzentrationen in Organen von Meerschweinchen, die mit 50 mg Nikotin behandelt wurden (Versuchsdauer 108 Stunden)

Behandelte Tiere n = 2 Mittelwert aus beiden Bestimmungen

Kontrolltiere n = 10 Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes

Werte: $\mu\text{g SCN}^-/\text{g Frischgewicht}$

Organ	Kontroll- tiere	Behandelte Tiere	Abweichung v. Kontrollwert
Gl. submaxillaris	502 $\pm$ 12	573	+ 71
Gl. parotis	199 $\pm$ 9	585	+ 386
Leber	495 $\pm$ 14	452	- 43
Pankreas	196 $\pm$ 5	226	+ 30
Lunge	333 $\pm$ 19	232	- 101
Niere	488 $\pm$ 14	410	- 78
Herz	331 $\pm$ 18	222	- 109
Milz	309 $\pm$ 17	272	- 37
Großhirn	226 $\pm$ 6	227	+ 1
Kleinhirn	182 $\pm$ 16	246	+ 64
Hirnstamm	177 $\pm$ 33	254	+ 77
Nebenniere	403 $\pm$ 5	318	- 85

Da die vorliegenden Untersuchungen von informativem Charakter waren, wurden die Versuche nur mit 2 Tieren durchgeführt; daher entfällt die Signifikanzberechnung. Es wurde nur der Mittelwert aus den beiden Bestimmungen gebildet.

V. DISKUSSION

Die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase wird durch Tabakrauch *in vitro* signifikant gehemmt. Cyanid ist nach Sörbo (39) als ein starker Inhibitor anzusehen. Da in Zigarettenrauch nach den Untersuchungen von Darby und Wilson (25) durchschnittlich 0,55 mg Blausäure/g gerauchter Tabak gebildet wird, was bei Abrauchen von 2 Zigaretten mit einer Tabakmenge von etwa 1,6 g einer Wirkung von ca. 0,85 mg CN^- auf das Homogenat entspricht, könnte für diese *in vitro* gezeigte Hemmung die direkte Wirkung von Cyanid als Inhibitor der Thiosulfat-Schwefeltransferase verantwortlich zu machen sein. Es müßte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob außer dem Cyanid andere Bestandteile des Tabakrauchs als Inhibitoren in Frage kommen.

Die Hemmung des Enzyms in Organen von Meerschweinchen, die dem Rauch von Zigaretten ausgesetzt waren, ließe sich durch den Mechanismus, der bei den *in vitro* Versuchen für die Hemmung verantwortlich ist, erklären, obgleich die Erhöhung der Rhodanidkonzentrationen der Organe zu diesen Ergebnissen in Gegensatz zu stehen scheint. Da die Enzymaktivitäten zum Teil jedoch sehr hoch sind, wäre es vorstellbar, daß die Zufuhr von Cyanid aus dem Tabakrauch das Enzym nicht in so starkem Maße zu hemmen vermag, daß das anfallende CN^- nicht noch zu SCN^- entgiftet werden könnte. Das würde sich dann, trotz Hemmung der Enzymaktivität, in einem Anstieg der Rhodanidkonzentrationen manifestieren. Zur Unterstützung dieser Annahme lassen sich die Befunde in Leber und Niere anführen. Diese Organe, die für Entgiftung und Ausscheidung auch aufgrund ihrer hohen Enzymaktivitäten am wichtigsten sind, werden durch den Berauchungsprozeß, dem die Tiere unterworfen waren, nicht beeinflußt, während der Rhodanidgehalt gerade dieser Organe auf einen Betrag, der dem doppelten Kontrollwert entspricht, angestiegen ist.

Um ungefähr vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden die Meerschweinchen im gleichen Zeitabstand beraucht, wie ihnen Nikotin injiziert wurde. Die Dosis von 2 x 5 mg Nikotin s. c. im Abstand von 12 Stunden genügte, um die Aktivitätshemmung des Enzyms und veränderte Rhodanidkonzentrationen zu erreichen. Da in jeder Zigarette ca. 1 mg Nikotin enthalten ist, wurden die Meerschweinchen 2 x im Abstand von 12 Stunden mit je 5 Zigaretten beraucht. Im Idealfall hätten sie also - außer dem Cyanid - 10 mg Nikotin aufgenommen.

Die Veränderungen in beiden Versuchsreihen sind auch gleichsinnig, nur werden durch den Berauchungsprozeß Leber, Niere, Pankreas und Lunge nicht beeinflusst im Gegensatz zu den mit Nikotin behandelten Tieren. Die Hemmwerte in den anderen Organen entsprechen sich in etwa. Beim Vergleich der Rhodanidkonzentrationen sind außer in der Gl. submaxillaris und der Nebenniere sehr ähnliche Werte zu konstatieren.

Durch länger dauernde Nikotinapplikation (70 mg über 7 Tage) wird die Thiosulfat-Schwefeltransferase-Aktivität in Leber und Niere - wenn auch zu einem geringen Prozentsatz - gehemmt, wohingegen diese Organe nach Berauchung der Tiere unbeeinflusst blieben. Die Rhodanidkonzentrationen, die generell gesehen die gleichen Befunde im Sinne einer Erhöhung zeigen, sind bei den Nikotintieren in der Leber gar nicht verändert und in der Niere nur leicht erhöht, während sie bei den berauchten Tieren auf das Doppelte des Kontrollwertes anstiegen.

Diese Ergebnisse könnten dahingehend interpretiert werden, daß das im Rauch enthaltene Nikotin nach Resorption die beschriebenen Wirkungen entfaltet. Die beobachteten Unterschiede in der Enzymaktivität und im Rhodanidgehalt könnten auf die sehr verschiedenen Resorptionsbedingungen bei Berauchung und Nikotininjektion zurückgeführt werden. Eine Addition der Wirkungen wäre denkbar.

Ob für diese nach Verabreichung von Tabakrauch und nach Nikotininjektion sehr ähnlichen Ergebnisse prinzipiell die gleichen Vorgänge die Aktivitätshemmung des Enzyms und die dabei gefundene Erhöhung der Rhodanidkonzentrationen verursachen, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Da die Anwendung von Nikotin keine Veränderung des Enzyms in vitro mit sich bringt, ist im Gegensatz zur Wirkung des Tabakrauchs bei den mit Nikotin behandelten Meerschweinchen ein direkter Einfluß auf die Thiosulfat-Schwefeltransferase auszuschließen.

Die Einwirkung von Nikotin über 5 Minuten auf die Gl. submaxillaris beim Hund war, obgleich das Nikotin die Drüse ohne Umweg passieren konnte, offensichtlich zu kurz, um eine Veränderung herbeizuführen. Dieser Befund und die Ergebnisse der Versuche mit länger dauernder Nikotinzufuhr könnten daraufhindeuten, daß Metaboliten des Nikotins für die Aktivitätshemmung verantwortlich sind. In dieser Richtung angestellte Untersuchungen in vitro konnten aufgrund von methodischen Schwierigkeiten nicht zur Klärung dieser Frage beitragen.

Man könnte sich andererseits auch vorstellen, daß der Effekt, vor allem auf den Rhodanidgehalt, sekundärer Natur ist. Durch Nikotin oder dessen Metaboliten könnte durch Freisetzung gefäßaktiver Stoffe die Durchblutung eines Organs so verändert werden, daß der Abtransport des gebildeten Rhodanids verringert oder verhindert wird und dadurch in den Organen erhöhte Rhodanidkonzentrationen zu finden sind.

Auf diese Weise ließen sich vor allem die schon nach Anwendung von 10 mg Nikotin und einer Versuchsdauer von 12 Stunden oben angeführten Ergebnisse deuten. Bei diesen Tieren ist einerseits die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase beträchtlich gehemmt, stärker als im Langzeitversuch (70 mg), auch in Organen, die im Langzeitversuch nicht verändert waren, wie Leber und Nebenniere. Andererseits sind die Rhodanidkonzentrationen aller Organe erhöht, und zwar wesentlich mehr vor allem in Leber, Niere und Gl. parotis, während die Werte in den Gehirnabschnitten sich entsprechen.

Da Nikotin besonders gehirngängig ist, könnte durch eine Veränderung der Durchblutung oder der Permeabilität der Gefäßwände, die zu einer Ödembildung führen würden, auch der bei diesen Tieren erniedrigte Proteingehalt der drei Gehirnabschnitte erklärt werden.

Abschließend wäre zu bemerken, daß es zwar gelungen ist, eine Beeinflussbarkeit der Thiosulfat-Schwefeltransferase im tierischen Organismus sowohl durch Tabakrauch als auch durch Nikotin zu zeigen, jedoch weitere Untersuchungen nötig sind, um die hier gefundenen Ergebnisse erklären zu können.

Was die Pathogenese der Tabakamblyopie und der anderen neurologischen Syndrome angeht, kann durch die Untersuchungsergebnisse die Hypothese einer Hemmung des Cyanid entgiftenden Enzyms wahrscheinlicher gemacht werden. Denn es ist möglich, die Aktivität der Thiosulfat-Schwefeltransferase durch geringe Mengen Tabakrauch wie auch Nikotin in relativ kurzer Zeit im Sinne einer starken Hemmung zu beeinflussen, was für das Zustandekommen einer Tabakamblyopie nach theoretischen Vorstellungen und klinischen Befunden zu fordern ist.

Daher sind zur weiteren Klärung der Pathogenese der Tabakamblyopie länger dauernde Untersuchungen angezeigt, um die bei tabakamblyopen Patienten gefundenen niedrigen Rhodanidwerte in Verbindung mit der zu erreichenden Enzymhemmung im Tierversuch reproduzieren zu können. Die eindeutige Antwort auf diese Fragestellung könnten nur Enzymbestimmungen bei tabakamblyopen Patienten erbringen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die in der Einleitung angeführten experimentellen Befunde und klinischen Beobachtungen lassen wechselseitige Beziehungen zwischen Cyanid- und Vitamin B₁₂-Stoffwechsel und mehreren neurologischen Syndromen, insbesondere der Tabakamblyopie erkennen. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann eine Beeinflussung des Vitamin B₁₂-Stoffwechsels und die Entstehung der erwähnten neurologischen Syndrome nur durch nicht im Rhodanid gebundenes CN⁻ hervorgerufen werden. Dies würde bedeuten, daß die Aktivität des Rhodanid bildenden Enzyms nicht ausreicht, um alles zugeführte Cyanid zu entgiften. Eine Verringerung der Aktivität des Enzyms könnte durch einen genetischen Defekt oder durch exogene Inhibitoren verursacht sein.

Aus diesen Gründen wurde das Verhalten der Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransferase (E. C. 2.8.1.1., früher Rhodanese) und der Rhodanidkonzentration unter dem Einfluß von Tabakrauch und seinem pharmakologisch aktivsten Bestandteil, dem Nikotin, als exogenen Inhibitoren im tierischen Organismus untersucht.

Über die folgenden Ergebnisse wird berichtet:

- a) Durch Einleiten von Zigarettenrauch in Homogenate von Meerschweinchenorganen wird das Enzym in einer Höhe von ca. 85 % gehemmt.
- b) In Organen von Meerschweinchen, die dem Rauch einer wechselnden Anzahl von Zigaretten ausgesetzt waren, ist die Enzymaktivität aller Organe, außer Leber und Niere, signifikant gehemmt. Der Rhodanidgehalt dieser Organe wurde in den meisten Fällen als signifikant erhöht gefunden.
- c) Nikotin übt in Ansätzen in vitro keinen Einfluß auf das Enzym aus.
- d) Kurzdauernder Einfluß von Nikotin auf die Gl. submaxillaris bei Hunden führte zu keinem statistisch signifikanten Ergebnis.
- e) Die Verabreichung von 70 mg Nikotin über 7 Tage bei Meerschweinchen bewirkte eine bis zu ca. 70%ige Hemmung der Enzymaktivität in allen untersuchten Organen außer Pankreas und Nebenniere. Der Rhodanidgehalt vieler Organe war signifikant erhöht.
- f) Bei Versuchen mit verschieden langer Nikotineinwirkung in vivo wurde die Hemmung der Thiosulfat-Schwefeltransferase-Aktivität und die Erhöhung der Rhodanidkonzentration bereits nach 12 Stunden und Applikation von 10 mg Nikotin festgestellt.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) PICK, F.: Verh. deut. Kongr. inn. Med. 27, 559 (1910)
- 2) LARSON, P. S., H. B. HAAG and H. SILVETTE:
Tobacco, Experimental and Clinical Studies;
The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1961)
- 3) MALISZEWSKI, T. F. and D. E. BASS:
J. Appl. Physiol. 8, 289 (1955)
- 4) OSBORNE, J. S., S. ADAMEK and M. E. HOBBS:
Anal. Chem. 28, 211 (1956)
- 5) STØA, K. F.: Årb. Univ. Bergen Md. Ser. 2, 1 (1956-57)
- 6) JOHNSTONE, R. A. W. and J. R. PLIMMER:
Chem. Rev. 59, 885 (1959)
- 7) MATTHEWS, D. M.: Lancet 1, 1289 (1961)
Clin. Sci. 22, 101 (1962)
- 8) MATTHEWS, D. M., J. WILSON and K. J. ZILKHA:
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 28, 426 (1965)
- 9) BASIL, W., J. K. BROWN and D. M. MATTHEWS:
J. Clin. Path. 18, 317 (1965)
- 10) WILSON, J. and D. M. MATTHEWS:
Clin. Sci. 31, 1 (1966)
- 11) DENSEN, P. M., B. DAVIDOW, H. E. BASS and E. W. JONES:
Arch. Environ Health 14, (1967)
- 12) U. S. SURGEON-GENERAL, Public Health Service Publication 1003 (1967).
U. S. Department of Health, Education and Welfare,
U. S. Government Printing Office, Washington
- 13) FOULDS, W. S., J. M. BRONTE-STEWART and I. A. CHISHOLM:
Nature 218, 586 (1968)
- 14) ARMENIO, G., P. D. LAFORGIA e M. BUONSANTO:
Boll. Soc. ital. Biol. Sper. 28, 1452 (1952);
29, 152 (1953); 29, 1095 (1953)

- 15) WOKES, F.: Lancet 2, 526 (1958)
- 16) LAWTON, A. H. , T. R. SWEENEY and H. C. DUDLEY:
J. Indust. Hyg. Toxicol. 25, 13 (1943)
- 17) MATTHEWS, D. M. , R. GUNNASEGARAM and J. C. LINNELL:
J. Clin. Path. 20, 683 (1967)
- 18) LINNELL, J. C. , A. D. M. SMITH, C. M. SMITH, J. WILSON, and
D. M. MATTHEWS:
Brit. Med. J. 2, 5559, 215 (1968)
- 19) LANG, S.: Arch. exp. Path. Pharm. 34, 247 (1894)
- 20) LANG, K.: Biochem. Z. 259, 243 (1933); 263, 262 (1933)
Z. Vit. -Horm. -Ferm. Forschung 2, 288 (1948-49)
- 21) REINWEIN, D.: H. -S. -Z. f. Biochem. 326, 94 (1961)
- 22) WOOD, J. L. and S. L. COOLEY:
J. Biol. Chem. 218, 449 (1956)
- 23) BOXER, G. E. and J. C. RICKARDS:
Arch. Biochem. Biophys. 30, 372 (1950); 39, 7
(1952)
- 24) MUSHETT, C. W. , K. L. KELLEY, G. E. BOXER and J. C. RICKARDS:
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 81, 234 (1952)
- 25) DARBY, P. W. and J. WILSON:
Brit. J. Ophthalm. 51, 336 (1967)
- 26) BRAEKKAN, O. R. , L. J. NJAA, and F. UTNE:
Acta pharmacol. (Kbh) 13, 228 (1957)
- 27) SMITH, A. D. M. and A. H. WATERS:
Nature, 200, 179 (1963)
- 28) SMITH, A. D. M. and S. DUCKETT:
Brit. J. Exp. Path. 46, 615 (1965)
- 29) WOKES, F. and C. W. PICARD:
Amer. J. Clin. Nat. 3, 383 (1955)
- 30) LINDSTRAND, K. , J. WILSON and D. M. MATTHEWS:
Brit. Med. J. 2, 988 (1966)

- 31) PHILIPPS, C. I. , R. G. AINLEY, P. VAN PERBORGH, E. J. WATSON-
WILLIAMS and A. C. BOTTOMLEY:
Nature 217, 67 (1968)
- 32) SMITH, A. D. M. : Lancet 1, 1001 (1961); 1, 1346 (1961); 2, 668
(1964)
- 33) SMITH, A. D. M. and M. FOULKES:
Nature 212, 787 (1966)
- 34) WILSON, J. : Brain 86, 347 (1963); Clin. Sci. 29, 505 (1965)
- 35) HEATON, J. M. , A. J. A. MC CORMICK and A. G. FREEMAN:
Lancet 2, 286 (1958)
- 36) WILSON, J. and M. J. S. LANGMAN:
Nature 212, 787 (1966)
- 37) MONEKOSSO, G. L. and J. WILSON:
Lancet 1, 1062 (1966)
- 38) CHISHOLM, I. A. , J. BRONTE-STEWART and W. S. FOULDS:
Lancet 2, 450 (1967)
- 39) SÖRBO, B. H. : Acta chem. Scand. 5, 724 (1951); 7, 1129 (1953)
- 40) HOPPE-SEYLER-THIERFELDER:
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse Bd. 6, Teil B, 780,
Springer Berlin (1966)
- 41) WEICHSELBAUM, T. E. :
Amer. J. Clin. Path. (Techn. Sect.) 10, 40 (1946)
- 42) DONTENWILL, W. , G. RECKZEH und L. STADLER:
Beiträge zur Tabakforschung Bd. 3, Heft 6, 438
(1966)
- 43) BRÜCKNER, J. and F. B. DESMOND:
Clin. chim. acta 3, 173 (1958)
- 44) RICHTERICH:
Klinische Chemie, Theorie und Praxis
Akademische Verlaganstalt Frankfurt/Main (1965)

- 45) LEUCHTENBERGER, C. , R. LEUCHTENBERGER und S. WEISS:
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 6, 39 (1965)
- 46) LORENZ, W. , St. HEITLAND, A. SCHAUER und H. GASTPAR:
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path.
259, 319 (1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am klinisch-chemischen Institut der Universität München experimentell zu arbeiten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Schievelbein bin ich für die Anleitung zu wissenschaftlichem Denken und Arbeiten und für die Unterstützung und Anregung zu meiner Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Als Tochter des Arztes Dr. med. Paul Schulz und seiner Ehefrau Dr. med. dent. Margarete, geb. Sodomann wurde ich am 15. November 1944 in Batzdorf Kreis Bielitz/Oberschlesien geboren. Nach der Flucht im Januar 1945 nahm die Familie ihren neuen Wohnsitz in Heddesheim im Landkreis Mannheim.

Von September 1950 bis Ostern 1954 besuchte ich die Volksschule in Heddesheim, ab Ostern 1954 die Albertus-Magnus-Schule, Realgymnasium in Viernheim, die ich nach bestandener Reifeprüfung im Februar 1963 verließ.

Das Studium der Zahnheilkunde begann ich an der Freien Universität in Berlin, wo ich von Sommersemester 1963 bis Sommersemester 1965 immatrikuliert war und im Oktober 1965 das zahnmedizinische Physikum ablegte.

Ab Wintersemester 1965 setzte ich mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort, bestand am 12. Juli 1968 die zahnärztliche Prüfung und erhielt am 31. Juli 1968 die Approbation als Zahnärztin.

